

R0/KR 18.10.2003



REC'D 04 NOV 2003

WIPO

PCT

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0000464
Application Number

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

출 원 년 월 일 : 2003년 01월 04일
Date of Application JAN 04, 2003

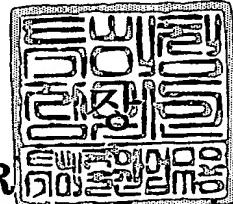
출 원 인 : 한국과학기술원
Applicant(s) Korea Advanced Institute of Science and Technology

2003 년 10 월 18 일



특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.04
【발명의 명칭】	반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석을 위한 단백질 칩
【발명의 영문명칭】	A Protein Chip for Analyzing Interaction Between Protein and Substrate Peptide Therefor
【출원인】	
【명칭】	한국과학기술원
【출원인코드】	3-1998-098866-1
【대리인】	
【성명】	이한영
【대리인코드】	9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】	1999-020229-3
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이상엽
【성명의 영문표기】	LEE, Sang Yup
【주민등록번호】	640412-1025515
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 212-702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이석재
【성명의 영문표기】	LEE, Seok Jae
【주민등록번호】	690227-1101616
【우편번호】	305-729
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 청구나래아파트 103-104
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	12
【서열목록의 전자파일】	첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이한영 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	13	면	13,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	10	항	429,000 원
【합계】			471,000 원
【감면사유】			정부출연연구기관
【감면후 수수료】			235,500 원
【첨부서류】			1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 기질 펩타이드를 링커 단백질을 매개로 기판에 고정시켜 제조한 단백질 칩 및 전기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법에 관한 것이다.

상기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법은 전기 단백질 칩에 고정된 기질 펩타이드에 특이적으로 반응하는 반응 단백질을 전기 단백질 칩에 가하고, 그들간의 반응을 검출하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의하면, 단백질 칩 상에서의 분자량이 작은 펩타이드와 분자량이 큰 효소단백질간 및 펩타이드와 반응항체간의 반응성을 높여 주어, 펩타이드와 단백질간 효과적인 반응분석을 신속하고 대량으로 수행할 수 있도록 함으로써, 펩타이드-단백질 반응에 기초한 효율적이고 경제적인 대량검색, 생화학적 분석, 신약 후보물질 분석 및 질병 진단 등의 연구와 응용에 크게 기여할 수 있을 것이다.

【대표도】

도 5

【색인어】

펩타이드-단백질 반응, 단백질 칩

【명세서】**【발명의 명칭】**

반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석을 위한 단백질 칩{A Protein Chip for Analyzing Interaction Between Protein and Substrate Peptide Therefor}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 렙틴-케타이드, 말릭효소-케타이드 및 렙틴-Ab1 단백질을 나타내는 모식도이다.

도 2는 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD를 나타내는 모식도이다.

도 3은 재조합 플라스미드 pTLMK3을 나타내는 모식도이다.

도 4는 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD를 나타내는 모식도이다.

도 5는 단백질 칩상에서의 렙틴-케타이드 단백질과 단백질 키나아제 A의 반응을 나타내는 형광분석 사진이다.

도 6은 단백질 칩상에서의 말릭효소-케타이드 단백질과 단백질 키나아제 A의 반응을 나타내는 형광분석 사진이다.

도 7은 단백질 칩상에서의 렙틴-Ab1 단백질과 Ab1 키나아제의 반응을 나타내는 형광분석 사진이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <8> 본 발명은 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석을 위한 단백질 칩에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 기질 펩타이드를 링커 단백질을 매개로 기판에 고정시켜 제조한 단백질 칩 및 전기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법에 관한 것이다.
- <9> 최근 게놈 프로젝트들이 완료되어 감에 따라, 생명현상의 기본이 되는 유전자에 대한 관심이 고조되고 있다. 현재 10여만 개로 예측되는 인간 유전자 중, 약 1만여 개의 기능이 밝혀져 있고, 이러한 유전자들은 대부분이 질환과 직접적인 연관이 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 대부분의 질병이 유전자 수준이 아닌 단백질 수준에서 유발되기 때문에, 현재까지 개발되었거나 개발 중에 있는 의약품의 95% 이상이 단백질을 타겟으로 하고 있다. 따라서, 단백질 칩은 특정 단백질에 특이적으로 상호작용하는 생체분자의 기능을 밝히고, 단백질 기능분석 및 네트워크 분석을 통하여 얻어진 자료를 바탕으로 고전적인 방법으로는 불가능하였던 질병에 대한 치료 및 예방법을 개발하는 연구에 있어서 핵심이 되는 기술이다.
- <10> 지금까지 진행되어온 단백질 칩에 관한 최신기술은 다음과 같이 크게 네 가지로 분류할 수 있다:
- <11> (1) DNA 마이크로어레이 기술을 이용하여 DNA와 단백질과의 상호작용을 칩 상에서 분석하는 기술이다. 칩 상에서 단일가닥 올리고뉴클레오타이드를 이중가닥 올리고뉴클레오타이드로 전환시킨 후, 다시 특정 DNA 서열에 특이적인 제한효소를 반응시켜 절단유무를 통해 DNA-단백질

상호작용을 검사함으로써, 새로운 DNA 결합 단백질을 발굴하고 그 특성을 밝혀내는 데 유용하다(참조: Bulyk, M.L. et al., *Nature Biotechnol.* 17:573-577, 1999).

<12> (2) 제한효소, 페록시다제, 포스파타제 및 단백질 키나아제 등의 여러 종류의 효소 및 항원-항체반응을 칩 상에서 분석하는 기술이다(참조: 미국특허공개 제 2002/0055186호 A1; PCT 공개 번호 WO01/83827A1; Braunwalder A. et al., *Anal. Biochem.*, 234:23-26, 1996; Houseman B. et al., *Nature Biotechnol.*, 20:270-274, 2002; Ruud M. et al., *Nature Biotechnol.*, 18:989-994, 2000). 특히, 본 기술은 단백질-단백질 상호작용, 키나아제-펩타이드 기질 반응, 단백질-리간드 결합반응을 통해 대량검색, 생화학적 분석, 신약 후보물질 분석, 질병 진단 등에 응용할 수 있다. 그러나, 키나아제 특이적인 기질인 펩타이드 또는 분자량이 작은 단백질을 고정할 경우, 비특이적인 고정을 막기 위해 사용되는 봉쇄물질인 소혈청알부민(BSA)으로 인하여 고정되는 물질이 묻혀버리는 제한점이 있으며, 또한, 칩 상에 서로 다른 종류의 항체를 고정하고, 형광체가 표지된 항원 혼합물과 반응시켰을 때, 항체의 60%만이 정량적인 결과를 나타냈으며, 단지 23%만이 정성적인 결과를 나타냈다고 보고되어 있다(참조: MacBeath G. et al., *Science*, 289:1760-1763, 2000; 및, Haab B. et al., *Genome Biol.* 2:research 0004, 2001).

<13> (3) cDNA 라이브러리로부터 대량의 단백질을 칩 상에서 발현하여 분석하는 기술이다(참조: PCT 공개번호 WO01/83827A1 및 WO02/50260). 본 기술은 단백질의 생화학적 활성에 대한 대량 검색에 유용하다(참조: Heng Zhu, et al., *Nature genetics* 26:283-289, 2000).

<14> (4) 친화성 태그를 이용하여 생체분자의 배향성(orientation)을 분자수준에서 조절하면서, 균일하고 안정된 생체분자의 단일층을 칩 표면에 형성시키는 기술을 이용하여 시료를 분석하는 기술이다(참조: 미국특허공개 제 2002/0055125호 A1; 미국특허 제 6,406,921호; Paul J.

et al., *JACS*, 122:7849–7850, 2000; RaVi A. *et al.*, *Anal. Chem.*, 73:471–480, 2001; 및, Benjamin T. *et al.*, *Tibtech.*, 20:279–281, 2002). 예를 들어, 단백질을 His-태그(tag) 융합된 형태로 발현시킨 다음, Ni-NTA 기능기가 고정된 칩에 반응시켜 고정시킴으로써, 생체분자의 활성을 유지시키거나 또는 인테인(intein)이 융합된 형태로 발현시켜 정제를 용이하게 할 뿐만 아니라, 특정 부위를 비오틴화시켜 아비딘 처리된 칩 상에서 일정방향으로 고정하여 보다 안정적이고 활성적인 상태를 유지시킬 수 있다(참조: Zhu *et al.*, *Science* 293:2101–2105, 2001; 및, Marie-Laure L. *et al.*, *JACS* 124:8768–8769, 2002). 또한, 지지체에 특이적으로 결합하는 단백질(칼모듈린 등) 및 태그(폴리 시스테인, 라이신, 히스티딘 등)를 사용하여 융합된 형태로 발현시키고 고정시켜, 단백질간 상호작용을 이용하여 단백질 정제, SPR(surface plasmon resonace) 및 FACS(fluorescence activated cell sorter)에 활용하였다(참조: Hentz, *Anal. Chem.* 68:3939–3944, 1996; Hodneland *et al.*, *PNAS* 99:5048–5052, 2002; Kukar *et al.*, *Anal. Biochem.* 306:50–54, 2002; 및, 미국특허 제 6,117,976호).

- <15> 그러나, 상기와 같은 다양한 단백질 칩 기술이 개발되었음에도 불구하고, 현재, 분자량이 작은 펩타이드(일반적으로 50 개 미만의 아미노산으로 구성)를 이용한 단백질 칩 기술은 펩타이드와 상호작용하는 거대분자(효소 및 항체)에 대한 공간적이고도 구조적인 문제로 고정화된 펩타이드와 반응물질 간의 상호작용이 어렵고, 형광체가 표지된 항체를 이용하여 반응의 유무를 검출하는데 제한점이 많아 실용화가 어려우며, 펩타이드를 칩 위에 고정하기 위해서는 높은 농도가 요구되어 경제성이 떨어지는 단점이 있다.
- <16> 따라서, 단백질 칩 상에서 분자량이 작은 기질 펩타이드와 분자량이 큰 반응 단백질 간의 상호작용을 효율적으로 분석할 수 있는 방법을 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <17> 이에, 본 발명자들은 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 상호작용을 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 문자량이 작은 기질 펩타이드를 링커단백질을 매개로 하여 기판에 고정시키고, 반응 단백질을 처리한 후, 그들의 상호반응을 항체를 이용하여 검출하면, 기질 펩타이드와 반응 단백질간의 특이적인 상호작용을 용이하고 효율적으로 분석할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.
- <18> 결국, 본 발명의 주된 목적은 기질 펩타이드를 링커 단백질을 매개로 기판에 고정시켜 제조한 단백질 칩을 제공하는 것이다.
- <19> 본 발명의 다른 목적은 전기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응 분석 방법에 관한 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <20> 본 발명의 단백질 칩은 기질 펩타이드를 링커 단백질과 융합시켜, 전기 링커 단백질을 매개로 한 형태로 기판에 고정함으로써 제조된다: 이때, 기질 펩타이드는 펩타이드 단량체, 단량체-프롤린-단량체의 이량체 또는 프롤린으로 연결된 다량체의 형태로 링커 단백질과 융합될 수 있다. 기질 펩타이드와 링커 단백질의 융합은 전기 융합된 형태의 기질-링커 단백질을 암호화하는 DNA를 포함하는 재조합 플라스미드로 형질전환된 미생물을 배양하여, 그로부터 분리, 정제하여 생산하거나, 또는 기질 펩타이드와 링커 단백질의 실험실적 조건에서의 화학적인 결합을 통하여 생산될 수 있으나, 경제적인 측면과 생산의 용이성의 측면에서 볼 때, 미생물 발현 시스템

을 이용하여 생산하는 것이 바람직하다. 사용되는 기질 펩타이드는 분석을 원하는 반응 단백질과 특이적으로 반응할 수 있는 그의 기질로서, 반응 단백질의 종류에 따라 선택될 수 있다. 사용되는 링커 단백질은 특별히 제한되는 것은 아니나, 렙틴 또는 말릭효소(malic enzyme) 등 미생물에서의 발현과 정제가 용이한 단백질을 사용함이 바람직하다. 사용되는 기판 역시 특별히 제한되는 것은 아니나, 침의 용도로 일반적으로 사용되는 알데히드 슬라이드가 바람직하다.

<21> 또한, 본 발명의 상기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법은 전기 단백질 칩에 고정된 기질 펩타이드에 특이적으로 반응하는 반응 단백질을 전기 단백질 칩에 가하고, 그들간의 반응을 검출하는 단계를 포함한다: 이때, 반응 단백질은 분석의 목적에 따라 효소 또는 항체 등으로 다양하게 선택하여 사용할 수 있으며, 기질 펩타이드의 선택과도 상호의존적으로 선택된다. 예를 들면, 반응 단백질로서 단백질 키나아제 A를, 그의 기질 펩타이드로서 켐타이드(서열번호 1)를 사용하거나 또는 반응 단백질로서 Ab1 키나아제를, 기질 펩타이드로서 Ab1(서열번호 8)을 사용할 수 있다. 기질 펩타이드와 반응 단백질간의 반응의 검출법은 반응 단백질의 특성에 따라 변화되나, 형광체로 표지된 항체를 이용하여 수행하는 것이 바람직하다. 예를 들어, 반응 단백질로 단백질 키나아제 A 또는 Ab1 키나아제를 사용한 경우, 전기 키나아제들에 의한 기질 펩타이드의 인산화 반응의 검출은 Cy3로 표지된 항인산화 세린 항체 또는 Cy5로 표지된 항인산화 타이로신 항체를 이용하여 수행함이 바람직하다.

<22> 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하고자 한다.

<23> 키나아제 등의 효소와 반응하는 펩타이드 기질을 칩에 고정할 경우, 기질과 효소와의 반응을 항체를 이용하여 검출할 시에는 항체와 항체기질과의 반응시 공간적, 구조적인 제한이 존재하고, 분자량이 작아 안정성도 많이 떨어지게 되는 제한점을 가지고 있다. 전기 문제를 해결하기 위하여, 본 발명자들은 유전자 재조합 기술을 이용하여, 펩타이드 기질을 대장균에서 불용성 응집체 형태 또는 N 말단 부위에 6개의 히스티딘 잔기가 결합된 수용성 형태로 과잉발현되는 링커 단백질에 융합된 형태로 발현시켰다: 인간유래 렙틴 및 N 말단 부위에 6개의 히스티딘 잔기가 결합된 말릭효소의 정지 코돈을 제거하였다. 그런 다음, 융합시키고자 하는 펩타이드 기질의 아미노산 서열에 정지 코돈을 연결시킴으로써, 단량체 형태로 발현되도록 하거나, 또는 두 펩타이드 기질을 프롤린으로 연결하여 이량체의 형태로 발현되도록 함으로써, 항체에 의한 검출이 보다 효율적이고 용이하도록 하였다. 도 1은 본 발명에서 제조한 렙틴-켐타이드, 말릭효소-켐타이드 및 렙틴-Ab1 단백질을 나타내는 모식도로서, 기질 펩타이드인 켐타이드와 Ab1이 단량체 형태와 프롤린으로 연결된 이량체 형태로 링커 단백질인 렙틴과 말릭효소에 융합된 형태를 보여준다.

<24> 구체적으로, 본 발명자들은 도 1에 나타난 바와 같은 단백질들을 발현시킬 수 있는 재조합 플라스미드를 각각 대장균에 형질전환시키고, 그를 배양하여 렙틴-켐타이드, 말릭효소-켐타이드 및 렙틴-Ab1의 3 종류의 단백질들을 불용성 응집체 또는 수용성 형태로 수득한 후, 정제하고, 알데히드 슬라이드에 고정하여 단백질 칩을 제조한 다음, 형광체가 표지된 항체와의 상호반응을 분석하였다. 그 결과, 단백질 칩 상에 분자량이 작은 켐타이드 등의 기질 펩타이드만을 고정시킨 경우에는 항체반응이 나타나지 않았지만, 렙틴이나 말릭효소 등의 링커 단백질과 결합시킨 형태의 펩타이드를 고정시킨 경우에는 항체반응이 특이적으로 나타났고, 단량체 형태보다는 이량체 형태에서 보다 반응성이 높게 나타나는 것을 확인하였다.

- <25> 따라서, 본 발명은 단백질 칩 상에서의 분자량이 작은 펩타이드와 분자량이 큰 효소단백질간 및 펩타이드와 반응항체간의 반응성을 높여 주어, 펩타이드와 단백질간 효과적인 반응분석을 신속하고 대량으로 수행할 수 있도록 함으로써, 펩타이드-단백질 반응에 기초한 효율적이고 경제적인 대량검색, 생화학적 분석, 신약 후보물질 분석 및 질병 진단 등의 연구와 응용에 크게 기여할 수 있을 것이다.
- <26> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- <27> 실시예 1: 재조합 플라스미드의 작제
- <28> 실시예 1-1: 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD의 작제
- <29> 단백질 키나아제 A에 특이적인 랙틴-켐타이드 단백질(참조: 도 1)을 발현하는 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD를 작제하였다: 단백질 키나아제 A에 특이적인 기질 펩타이드인 켐타이드(서열번호 1)를 인간유래 랙틴에 단량체 형태로 융합시키기 위하여, 인간유래의 414bp 크기의 랙틴 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pED0b5(참조: Jeong, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65(7):3027-3032, 1999)를 주형 DNA로 하고, 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*의 절단위치를

포함하는 하기의 프라이머 1 및 캠타이드 유전자의 서열을 포함하는 프라이머 2를 사용하여 PCR을 수행하였다.

<30> 프라이머 1: 5'-CGGAATTCATATGGTGCCATCCAAAAAGTCCA-3' (서열번호 2); 및,

<31> 프라이머 2: 5'-GCGGATCCTTAGCCCAGGCTCGCACGACGCAGGCACCCAGGGCTGAGG-3'

<32> (서열번호 3)

<33> 또한, 이량체 형태로 융합시키기 위하여, 상기와 동일한 주형 DNA와 상기 프라이머 1 및 하기의 프라이머 3을 사용하는 PCR을 수행하여, *BamHI*의 절단위치와 정지코돈을 제거시킨 주형 DNA를 수득하였다.

<34> 프라이머 3: 5'-GCGGATCCTTAGCCCAGGCTCGCGCGCGCAGGGGGCCCAGGCTCGCACGACG-3'

<35> (서열번호 4)

<36> 그런 다음, 제한효소 *BamHI*의 절단위치와 정지코돈이 포함된 캠타이드가 C-말단에 이량체 형태로 융합된 형태를 암호화하는 유전자를 포함하는 DNA를 수득하기 위하여, 하기의 프라이머 4를 이용한 PCR을 수행하였다.

<37> 프라이머 4: 5'-GCGGATCCTTAGCCCAGGCTCGCGCGCGCAGGGGGCCCAGGCTCGCACGACG-3'

<38> (서열번호 5)

- <39> PCR은 다음과 같은 조건에서 수행하였다: 첫번째 변성(denaturation)을 94°C에서 5분간 1회 수행하고, 두번째 변성을 94°C에서 1분간, 교합(annealing)을 56°C에서 50초간, 연장(extension)을 72°C에서 90초간 수행하는 과정을 30회 반복하였으며, 72°C에서 5분간 마지막 연장(extension)을 1회 수행하였다. PCR을 수행하여 증폭된 DNA를 아가로즈 젤 전기영동법을 사용하여, 약 435 및 459bp 크기의 DNA를 분리하고, 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여 DNA 단편을 수득하였다. 그런 다음, T7 프로모터를 포함하는 플라스미드 pET-3a(Novagen, USA)를 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하고, 전기 DNA 단편과 혼합하여 T4 DNA 리가아제(ligase)로 연결시켜 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD를 작제하였다(참조: 도 2). 도 2는 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD를 나타내는 모식도로서, 전기 재조합 플라스미드 pLKM과 pLKD는 인간유래의 렙틴을 암호화하는 cDNA, 단백질 키나아제 A에 특이적인 켐타이드를 암호화하는 올리고뉴클레오티드 및 카나마이신 저항유전자를 포함하며, 각각 렙틴-단량체 켐타이드 또는 렙틴-이량체 켐타이드 형태의 단백질을 발현시킬 수 있다.
- <40> 전기 재조합 플라스미드를 열충격(heat shock) 방법을 사용하여 대장균 BL21(DE3)[*F*- *ompT* *hsdSB(rB-* *mB-*) gal dcm (DE3) a prophage carrying the T7 RNA polymerase gene](Novagen, USA)에 도입하여, 대장균을 형질전환시키고, 카나마이신(50 µg/mL)을 포함하는 LB 평판배지에서 배양하여 형질전환된 대장균을 선별하였다. 전기 대장균으로부터 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD를 분리하고, 제한효소 *NdeI*과 *BamHI*으로 절단하여, 약 435 및 459bp 크기의 DNA 단편을 수득하였다. 전기 DNA 단편은 인간유래의 렙틴에 펩타이드 기질인 켐타이드가 융합된 형태의 단백질을 암호화하는 유전자이다.

<41> 실시예 1-2: 재조합 플라스미드 pTLMK3의 작제

<42> 단백질 키나아제 A에 특이적인 말릭효소-케타이드 단백질(참조: 도 1)을 발현하는 재조합 플라스미드 pTLMK3를 작제하였다: 대장균 K-12로부터 유도된(derived) 대장균 W3110(λ^- , F^- , 원형양균(prototroph))의 염색체 DNA를 주형으로 하고, 제한효소 *NcoI*과 *XbaI*의 절단위치를 포함하는 하기의 프라이머 5(N-말단에 6개의 히스티딘 잔기를 암호화하는 서열이 포함되도록 고안) 및 프라이머 6(C-말단에 켐타이드 유전자의 서열을 포함하도록 고안)을 사용하여, N 말단에 6 개의 히스티딘 잔기가 연결된 말릭효소를 수득하기 위한 PCR을 전기 실시예 1에서와 동일한 조건으로 수행하였다(참조: Hong *et al.*, Biotechnol. Bioeng. 20; 74(2):89-95, 2001).

<43> 프라이머 5: 5'-CATGCCATGGGCATCACCATCATCACCATGATATTCAAAAAAGAGTG-3'

<44> (서열번호 6); 및,

<45> 프라이머 6: 5'-GCTCTAGATTAGCCCAGGCTCGCACGACGCAGGATGGAGGTACGGCGGTA-3'

<46> (서열번호 7)

<47> PCR을 수행하여 증폭된 DNA를 아가로즈 겔 전기영동법을 사용하여, 약 1782bp 크기의 DNA를 분리하고, 제한효소 *NcoI*과 *XbaI*으로 절단한 다음, 동일한 제한효소로 절단한 플라스미드 pTrc99A(Pharmacia Biotech Co., Sweden)에 삽입하여 재조합 플라스미드 pTLMK3를 작제하였다(참조: 도 3). 도 3은 재조합 플라스미드 pTLMK3을 나타내는 모식도로서, 전기 pTLMK3는 대장균 유래의 말릭효소를 암호화하는 cDNA, 켐타이드를 암호화하는 올리고펩타이드 및 암피실린

저항유전자를 포함하며, N 말단에 6개의 히스티딘 잔기가 연결된 말릭효소-단량체 켐타이드 단백질을 발현시킬 수 있다.

<48> 다음, 전기 재조합 플라스미드로 대장균 XL1-Blue(Stratagene, La Jolla, USA)를 형질전환시키고, 암피실린(50 μ g/mL)을 포함하는 LB 평판배지에서 배양하여 형질전환 대장균을 선별한다음, 그로부터 재조합 플라스미드 pTLMK3를 분리하였다.

<49> 실시예 1-3: 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD의 작제

<50> Ab1 키나아제에 특이적인 렙틴-Ab1 단백질(참조: 도 1)을 발현하는 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD를 작제하였다: Ab1(서열번호 8)을 암호화하는 DNA 서열을 제한효소 *NdeI* 및 *BamHI*으로 절단하여, 약 477bp 및 516bp의 DNA 단편을 수득하하는 한편, T7 프로모터를 포함하는 플라스미드 pET-30a(Novagen, USA)를 동일한 제한효소인 *NdeI* 및 *BamHI*으로 절단하였다. 링커 단백질로 선정된 인간 유래의 438bp 렙틴 유전자를 수득하기 위하여, 재조합 플라스미드 pEDOb5(참조: Jeong, et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:3027-3032, 1999)를 주형으로 하고, 제한효소인 *NdeI* 및 *BamHI*의 절단위치를 포함하는 하기의 프라이머 7 및 8을 사용하여, PCR을 수행하였다.

<51> 프라이머 7: 5'-CGGAATTCTATGGTGCCCATCCAAAAAGTCCA-3'(서열번호 9); 및,

<52> 프라이머 8: 5'-CGGGATCCTCATTTTTTCGCAAACGGCGCCGCATAGATCGCTTCG

<53> CACCCAGGGCTGAGGT-3'(서열번호 10)

<54> 또한, 이량체 형태로 융합시키기 위하여, 상기와 동일한 주형 DNA와 상기 프라이머 1 및 하기의 프라이머 9를 사용하는 PCR을 수행하여, *BamHI*의 절단위치와 정지코돈을 제거시킨 주형 DNA를 수득하였다.

<55> 프라이머 9: 5'-CGGGATCCTTTTTTCGCAAACGGCGCCGCATAGATCGCTCGCACCCAGGGC

<56> TGAGGT-3(서열번호 11)

<57> 합성된 프라이머 7 및 9를 이용하여 PCR로 증폭한 후, 이량체 PCR 산물을 얻기 위하여, *BamHI*의 절단위치를 포함하는 프라이머 10을 제작하였다.

<58> 프라이머 10: 5'-CGGGATCCTCATTATTTTTTCGCAAACGGCGCCGCATAGATCGCGGGTTT

<59> TTTTCGCAAACGGCGC-3'(서열번호 12)

<60> PCR을 수행하여 증폭된 DNA를 아가로즈 젤 전기영동법을 사용하여, 약 477bp 및 516bp 크기의 DNA를 분리하고, 제한효소 *NdeI* 및 *BamHI*으로 절단한 다음, 동일한 제한효소로 절단된 플라스미드 pET-30a에 삽입하여, 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD를 작제하였다(참조: 도 4). 도 4는 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD를 나타내는 모식도로서, pLAM 및 pLAD는 인간유래의 렙틴을 암호화하는 cDNA, Ab1을 암호화하는 올리고뉴클레오티드 및 카나마이신 저항유전자를 포함하며, 각각 렙틴-단량체 Ab1 및 렙틴-이량체 Ab1 형태의 단백질을 발현시킬 수 있다.

<61> 다음, 전기 재조합 플라스미드로 대장균 BL21(DE3)를 형질전환시키고, 카나마이신($50\mu\text{g}/\text{mL}$)을 포함하는 LB 평판배지에서 배양하여 형질전환 대장균을 선별한 후, 그로부터 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD를 분리하였다.

<62> 실시예 2: 단백질 키나아제 A를 위한 단백질 칩의 제작과 분석 (I)

<63> 실시예 2-1: 렙틴-케타이드 단백질을 탐침으로 포함하는 단백질 칩 제작

<64> 렙틴-케타이드 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pLKM 및 pLKD로 각각 형질전환된 전기 실시예 1-1의 재조합 대장균을 200mL의 LB 배지에 접종하여 37°C에서 배양하고, 600nm 파장에서 측정한 광학밀도(OD)가 0.7이 되었을 때, 1mM의 IPTG를 첨가하여 렙틴-케타이드 단백질의 발현을 유도하였다. 4시간 후, 배양액을 4°C, 6000rpm의 조건으로 5분동안 원심분리하여 수득한 침전물을 100mL의 TE 완충용액(Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM, pH 8.0)으로 세척하고, 다시 4°C, 6000rpm으로 5분동안 원심분리한 다음, 100mL의 TE 완충용액에 혼탁하여 4°C에서 초음파 분쇄기(Branson Ultrasonics Co., USA)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄한 용액을 4°C, 6000rpm으로 30분동안 원심분리하여 수득한 침전물을 10mL의 변성용액(8 M Urea, 10 mM Tris, pH 8.0)에 혼탁하고, 상온에서 4시간 동안 교반하여 용해시킨 후, 다시 4°C, 6000rpm으로 30분동안 원심분리하고, 상층액을 회수하여 $0.2\mu\text{m}$ 여과기로 여과하였다. 여과된 용액에 포함된 단백질을 브래드포드 단백정량법(참조: Bradford, M. et al., *Anal. Biochem.* 72:248-254, 1976)으로 정량하고, 고정용액(40% glycerol, PBS, pH 7.4)을 사용하여

1mg/mL 농도로 희석하였다. 전기 희석용액을 마이크로어레이어(참조: Yoon, S. H., *Microbiol. Biotechnol.*, 10(1):21-26, 2000)를 이용하여 알데히드 슬라이드 위에 300 내지 500 μ m 간격(500개/1cm²)으로 점적하고, 30°C 휴미드 챔버(humid chamber)에서 1시간 동안 고정한 후, 봉쇄용액(1% BSA, PBS, pH 7.4)과 상온에서 1시간동안 반응시켜, 단백질 칩을 제조하였다. 대조군으로는 켈타이드 1 mg/mL, 소혈청알부민(BSA) 1 mg/mL, 렙틴 1 mg/mL 및 인산염 완충용액을 동일한 고정용액으로 희석하여 사용하였다.

<65> 실시예 2-2: 단백질 키나아제 A의 분석

<66> 전기 실시예 2-1에서 제조한 단백질 칩을 세척용액(20 mM Tris, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.1% Triton-X100, pH 7.5)으로 5분간 3회 세척하고, 키나아제 용액(50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.5)으로 1회 세척한 후, 100 μ M의 ATP가 첨가된 200 μ l의 키나아제 용액을 칩 위에 분주하고, 커버웰로 덮어 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면, 키나아제 용액으로 충분히 세척하고, 200 μ l의 키나아제 반응용액(100 μ M ATP 및 10 유닛(unit)의 cAMP-의존성 단백질 키나아제를 포함하는 키나아제 용액)을 분주한 다음, 커버웰로 덮어 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면, 인산염 완충용액(PBS, pH 7.4)으로 충분히 세척하고, Cy3로 표지된 항인산화 세린 항체와 반응시킨 후, 다시 충분히 세척하고, 200g에서 1분동안 원심분리하여 여분의 용액을 완전히 제거한 다음, 스캔어레이 5000(ScanArray 5000, Axon Instrument, Forster, USA) 레이저 스캐너를 이용하여 반응을 분석하였다(참조: 도 5). 도 5는 단백질 칩 상에서의 렙틴-켈타이드 단백질과 단백질 키나아제 A의 반응을 나타내는 형광분석 사진으로, 1은 렙틴-이량체 켈타이드(1mg/mL), 2는 10배 희석된 전기 이량체, 3은 렙틴-단량체 켈타이드

(1mg/mL), 4는 10배 희석된 전기 단량체, P는 PBS, K는 켈타이드(1mg/mL)를 나타낸다. 도 5에 서 보듯이, 단백질 키나아제 A는 렙틴과 결합된 형태의 켈타이드와는 특이적으로 반응하였지만, 단독형태의 켈타이드와는 전혀 반응하지 않았다. 또한, 2 및 4의 희석된 상태에서는 단량체보다는 이량체의 반응성이 보다 높았다. 따라서, 예상한 바와 같이, 단백질 칩 상에서 작은 펩타이드는 효소 단백질과의 반응성이 낮지만, 렙틴같은 링커 단백질과 결합된 형태의 펩타이드는 반응성이 높으며, 단량체 형태보다는 이량체 형태로 링커 단백질과 결합된 형태의 반응성이 보다 높은 것을 확인할 수 있었다.

<67> 실시예 3: 단백질 키나아제 A를 위한 단백질 칩의 제작과 분석 (II)

<68> 실시예 3-1: 말릭효소-켈타이드 단백질을 탐침으로 포함하는 단백질 칩 제작

<69> 말릭효소-켈타이드 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pTLMK3로 형질 전환된 전기 실시예 1-2의 재조합 대장균을 전기 실시예 2-1에서와 동일한 방법으로 배양하고, 초음파 분쇄기를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 파쇄한 용액을 4°C, 6000rpm으로 30분동안 원심분리하여 상층액을 수집하고, 평형용액(50mM NaH₂PO₄, 300mM NaCl, 10mM 이미다졸, pH 8.0)에 투석한 후, 니켈-킬레이트 수지(Quiagen, USA)를 이용하여 정제한 다음, 다시 PBS로 투석하고, 0.2 μm 여과기로 여과하였다. 여과된 용액에 포함된 단백질을 전기 실시예 2-1에서와 동일한 방법으로 정량하고, 희석한 후, 알데히드 슬라이드에 점적하여 단백질 칩을 제조하였다.

<70> 실시예 3-2: 단백질 키나아제 A의 분석

<71> 전기 실시예 2-2에서와 동일한 방법으로 전기 실시예 3-1에서 제조한 단백질 칩에서의 단백질 키나아제 A의 반응을 분석하였다(참조: 도 6). 도 6은 단백질 칩상에서의 말릭효소-켐타이드 단백질과 단백질 키나아제 A의 반응을 나타내는 형광분석 사진으로, 1은 양성 대조군(Cy3로 표지된 항인산화 세린 항체), 2-1은 렙틴-단량체 켐타이드, 2-2는 렙틴-이량체 켐타이드, 3은 켐타이드, 4는 PBS, 5는 말릭효소-단량체 켐타이드를 나타낸다. 도 6에서 보듯이, 단백질 키나아제 A는 렙틴 또는 말릭효소와 결합된 형태의 켐타이드와는 특이적으로 반응하였지만, 단독 형태의 켐타이드와는 거의 반응하지 않았다. 따라서, 도 5의 결과에서와 같이, 단백질 칩상에서 작은 펩타이드는 효소 단백질과의 반응성이 낮지만, 렙틴 또는 말릭효소같은 링커 단백질과 결합된 형태의 펩타이드는 반응성이 높은 것을 다시 한 번 확인할 수 있었다.

<72> 실시예 4: Ab1 키나아제를 위한 단백질 칩의 제작과 분석<73> 실시예 4-1: 렙틴-Ab1 단백질을 탐침으로 포함하는 단백질 칩 제작

<74> 렙틴-Ab1 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는 재조합 플라스미드 pLAM 및 pLAD로 각각 형질전환된 대장균을 전기 실시예 2-1에서와 동일한 방법으로 배양하여, 그로부터 렙틴-Ab1 단백질을 수득하고, 알데히드 슬라이드에 점적하여 단백질 칩을 제조하였다.

<75> 실시예 4-2: Ab1 키나아제의 분석

<76> 전기 실시예 4-1에서 제조한 단백질 칩을 세척용액(PBS, pH 7.5)으로 5분간 3회 세척하고, 키나아제 용액(50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol, 0.01% Brij 36, pH 7.5)으로 1회 세척한 후, 100 μM의 ATP가 첨가된 200 μl의 키나아제 용액을 칩 위에 분주하고, 커버웰로 덮어 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면, 키나아제 용액으로 충분히 세척하고, 200 μl의 키나아제 반응용액(100 μM ATP 및 10 유닛의 Ab1 키나아제)을 분주한 다음, 커버웰로 덮어 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면, 인산염 완충용액(PBS, pH 7.4)으로 충분히 세척하고, Cy5로 표지된 항인산화 타이로신 항체와 반응시킨 후, 다시 충분히 세척하고, 200g에서 1분동안 원심분리하여 여분의 용액을 완전히 제거한 다음, 반응결과를 분석하였다(참조: 도 7). 도 7은 단백질 칩상에서의 렙틴-Ab1 단백질과 Ab1 키나아제의 반응을 나타내는 형광분석 사진으로, 1은 렙틴-이량체 Ab1, 2는 렙틴-단량체 Ab1, P는 PBS를 나타낸다. 도 7에서 보듯이, Ab1 키나아제는 렙틴과 결합된 Ab1 단량체 및 이량체와 특이적으로 반응한 것을 확인할 수 있었다.

<77> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<78> 이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 기질 펩타이드를 링커 단백질을 매개로 기판에 고정시켜 제조한 단백질 칩 및 전기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법을 제공한다. 상기 단백질 칩을 이용한 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법은 전기 단백질 칩에 고정된 기질 펩타이드에 특이적으로 반응하는 반응 단백질을 전기 단백질 칩에 가하고, 그들간의 반응을 검출하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의하면, 단백질 칩 상에서의 분자량이 작은 펩타이드와 분자량이 큰 효소단백질간 및 펩타이드와 반응항체간의 반응성을 높여 주어, 펩타이드와 단백질간 효과적인 반응분석을 신속하고 대량으로 수행할 수 있도록 함으로써, 펩타이드-단백질 반응에 기초한 효율적이고 경제적인 대량검색, 생화학적 분석, 신약 후보물질 분석 및 질병 진단 등의 연구와 응용에 크게 기여할 수 있을 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

기질 펩타이드를 링커 단백질을 매개로 기판에 고정시켜 제조한 단백질 칩.

【청구항 2】

제 1항에 있어서,

링커 단백질은 렙틴 또는 말릭효소(malic enzyme)인 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

【청구항 3】

제 1항에 있어서,

기질 펩타이드는 펩타이드 단량체, 단량체-프롤린-단량체의 이량체 또는 프롤린으로 연결된 다량체의 형태로 링커 단백질과 융합되는 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

【청구항 4】

제 3항에 있어서,

펩타이드 단량체는 캠타이드(서열번호 1) 또는 Ab1(서열번호 8)인 것을 특징으로 하는 단백질 칩.

【청구항 5】

제 1항에 있어서,

기판은 알데히드 슬라이드인 것을 특징으로 하는

단백질 칩.

【청구항 6】

제 1항의 단백질 칩에 고정된 기질 펫타이드에 특이적으로 반응하는 반응 단백질을 전기 단백질 칩에 가하고, 기질 펫타이드와 반응 단백질간의 반응을 검출하는 단계를 포함하는, 반응 단백질과 그의 기질 펫타이드간의 반응분석 방법.

【청구항 7】

제 6항에 있어서,

반응 단백질은 효소 또는 항체인 것을 특징으로 하는

반응 단백질과 그의 기질 펫타이드간의 반응분석 방법.

【청구항 8】

제 7항에 있어서,

효소는 단백질 키나아제 A 또는 Ab1 키나아제인 것을 특징으로 하는

반응 단백질과 그의 기질 펫타이드간의 반응분석 방법.

【청구항 9】

제 6항에 있어서,

기질 펩타이드와 반응 단백질간의 반응의 검출은 형광체로 표지된 항체를 이용하여 수행되는 것을 특징으로 하는

반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법.

【청구항 10】

제 8항에 있어서,

키나아제에 의한 기질 펩타이드의 인산화 반응의 검출은 Cy3로 표지된 항인산화 세린 항체 또는 Cy5로 표지된 항인산화 타이로신 항체를 이용하여 수행하는 것을 특징으로 하는 반응 단백질과 그의 기질 펩타이드간의 반응분석 방법.

【도면】

【도 1】



-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly



-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly-Pro-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly



-Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys



-Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys-Pro-Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys



-Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly

펩타이드 아미노산 서열 : Leu-Arg-Arg-Ala-Ser-Leu-Gly

Ab1 아미노산 서열 : Glu-Ala-Ile-Tyr-Ala-Ala-Pro-Phe-Ala-Lys-Lys

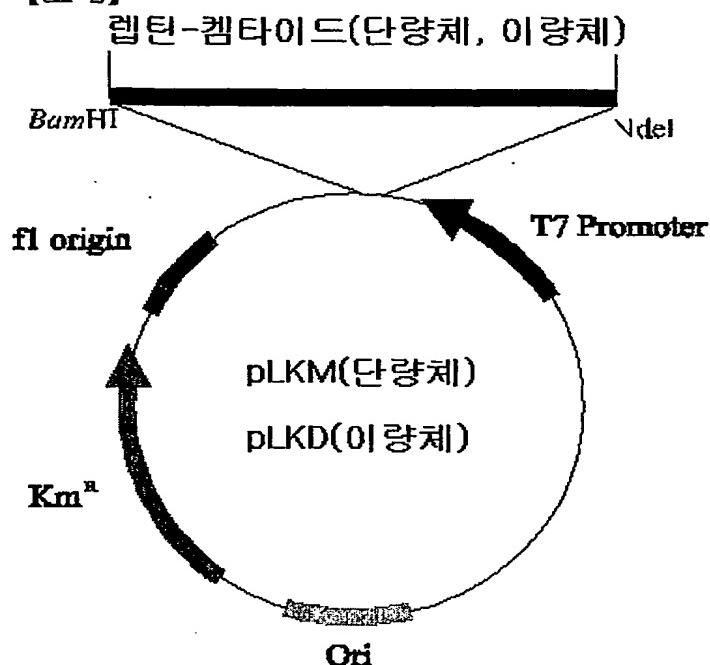


: 렌틴

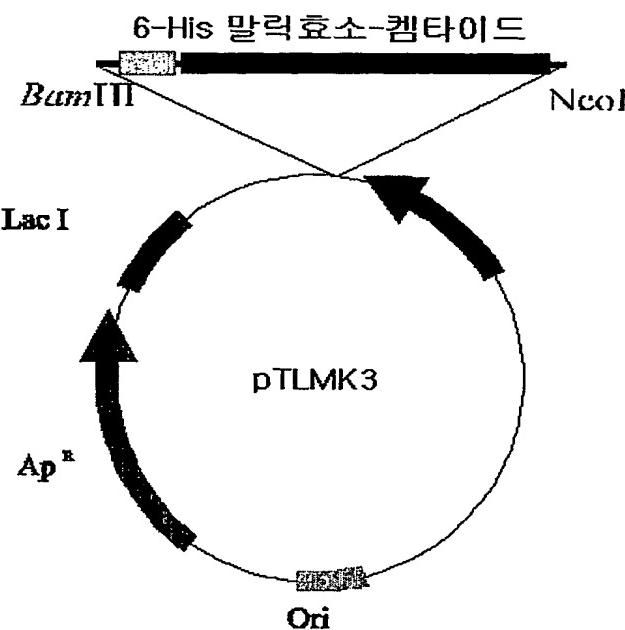


: 말릭효소

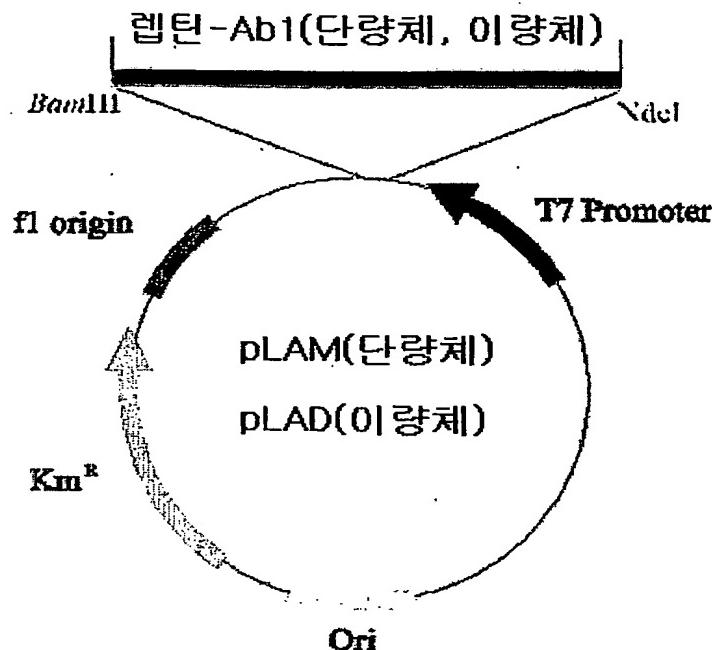
【도 2】



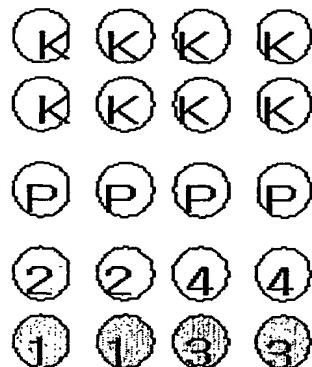
【도 3】



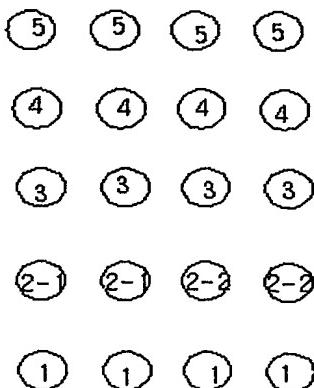
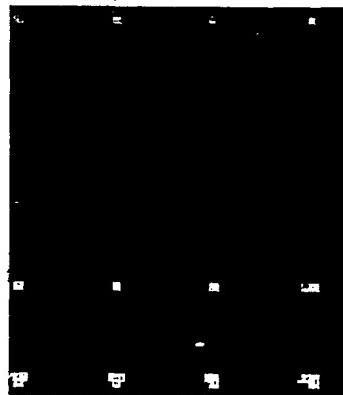
【도 4】



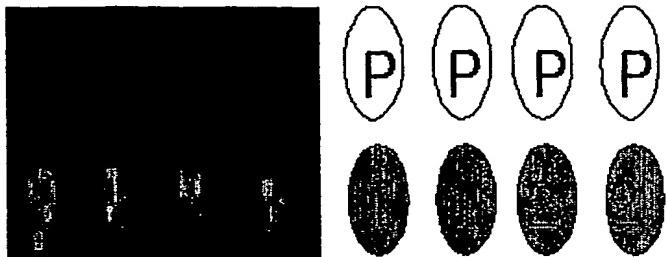
【도 5】



【도 6】



【도 7】



【서열목록】

<110> Korea Advanced Institute of Science and Technology <120> A Protein Chip
 for Analyzing Interaction Between Protein and Substrate Peptide Therefor <
 160> 12 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211> 7 <212> PRT <213>
 Artificial Sequence <220> <223> camtide <400> 1 Leu Arg Arg Ala Ser Leu Gly
 5 <210> 2 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <
 223> primer 1 <400> 2 cggaattcat atggtgccca tccaaaaagt cca
 33 <210> 3 <211> 48 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 2 <400> 3 gcggatcctt agcccaggct cgcacgacgc aggcacccag ggctgagg
 48 <210> 4 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 3 <400> 4 gcggatcctt agcccaggct cgcgcggcgc agggggccca ggctcgacg acg
 53 <210> 5 <211> 53 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
 primer 4 <400> 5 gcggatcctt agcccaggct cgcgcggcgc agggggccca ggctcgacg acg
 53 <210> 6 <211> 47 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 5 <400> 6 catgccatgg gcatcaccat catcaccatg atattcaaaa aagagtg
47 <210> 7 <211> 50 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 6 <400> 7 gctcttagatt agcccaggct cgcacgacgc aggatggagg tacggcgta
50 <210> 8 <211> 11 <212> PRT <213> Artificial Sequence <220> <223>

Ab1 <400> 8 Glu Ala Ile Tyr Ala Ala Pro Phe Ala Lys Lys 1 5
10 <210> 9 <211> 33 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 7 <400> 9 cggaattcat atggtgccca tccaaaaagt cca
33 <210> 10 <211> 67 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 8 <400> 10 cgggatcctc attattttt ttcgcaaac ggccgcgtt agatcgcttc
gcacccaggg 60 ctgaggt
67 <210> 11 <211> 61 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 9 <400> 11 cgggatcctt ttttttcgc aaacggcgcc gcatagatcg cttcgaccc
aggctgagg 60 t
61 <210> 12 <211> 71 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>

primer 10 <400> 12 cgggatcctc attattttt ttcgcaaac ggccgcgtt agatcgcggtt
ttttttttc 60 gcaaacggcg c